kikkoman

醸造分析キット

「酸性カルボキシペプチダーゼ測定キット」取扱い説明書

商品コード:60219

注意！

1. キット中の試薬を飲んだり、素手で触れたり、目に入れたりしないで下さい。
2. 取扱い説明書の〔使用上または取扱い上の注意〕に従って取扱って下さい。

〔用途〕

米麹抽出液中の酸性カルボキシペプチダーゼ活性の測定に用います。このキットは上記酵素活性の測定以外の目的では使用しないで下さい。

〔測定原理〕

$$\text{Cbz-Tyr-Ala} \xrightarrow{\text{酸性カルボキシペプチダーゼ}} \text{Cbz-Tyr + L-Ala}$$

$$\text{L-Ala + NAD}^+ \xrightarrow{\text{アラニンデヒドロゲナーゼ}} \text{Pyruvate + NH}_4^+ + \text{NADH}$$

$$\text{NADH} \xrightarrow{\text{テトラゾリウム塩、PMS}} \text{発色}$$

基質の Cbz-Tyr-Ala*1 は、酸性カルボキシペプチダーゼによって分解され、L-Ala*2 を生じます。この反応は、トリス緩衝液を加えることにより停止します。次に、生成した L-Ala は NAD^+の存在下アラニンデヒドロゲナーゼを添加することによって特異的に分解され、NADH が生じます。この生成した NADH を WST-8*3 および PMS*4 で発色させ、460 nm で定量することにより酸性カルボキシペプチダーゼ活性を測定します。

*1 Cbz-Tyr-Ala:カルボベンゾキシ-L-チロシル-L-アラニン

*2 L-Ala:L-アラニン

*3 WST-8:2-(2-ﾒﾄｷｼ-4-ﾆﾄﾛﾌｪﾆﾙ)-3-(4-ﾆﾄﾛﾌｪﾆﾙ)-5-(2,4-ｼﾞｽﾙﾎﾌｪﾆﾙ)-2H-ﾃﾄﾗｿﾞﾘｳﾑ、一ナトリウム塩

*4 PMS:1-ﾒﾄｷｼ-5-ﾒﾁﾙﾌｪﾅｼﾞﾆｳﾑ ﾒﾄｻﾙﾌｪｲﾄ

〔特徴〕

1. 酸性カルボキシペプチダーゼ活性を特異的に測定することができます。
2. 米麹抽出液を透析することなく、そのまま測定できます。
3. 測定試料中のアミノ酸の影響を受けません。

〔キットの構成〕

本製品は以下の試薬より構成されています。

(100 回測定分)

試薬名	主成分	数量
基質溶液	Cbz-Tyr-Ala NAD+*5 酢酸緩衝液	100 mL 1 本
反応停止液	WST-8 トリス緩衝液	100 mL 2 本
定量用酵素液	アラニンデヒドロゲナーゼ	10 mL 1 本
定量用発色液	PMS	10 mL 1 本
標準液	L-Ala	10 mL 1 本

*5 基質溶液以外の各試薬は防腐剤としてアジ化ナトリウムを 0.1%含んでいます。

〔測定方法〕

1. 測定試料の調製

米麹を所定法記載の方法*6 で抽出します。すなわち、米麹 10g に 0.5% NaCl を含む 10mM 酢酸緩衝液(pH5.0)を 50mL 加え、低温室(5℃以下)で一夜、または室温(15～20℃)で 3 時間ときどき振りまぜながら浸出した後、濾紙でろ過します(抽出率 5 倍となります)。この抽出液を、希釈液*7 で通常 5 倍に希釈したものを測定試料とします。

*6 第四回改正 国税庁所定分析法注解 226-228頁

*7 希釈液には、0.5% NaCl を含む 10mM 酢酸緩衝液(pH 5.0)を用いますが、10 mM 酢酸緩衝液(pH 5.0)または、蒸留水でも代用可能です。

2. 測定試薬の調製

基質溶液、酵素溶液および反応停止液は開栓して、そのまま使用します。

3. 測定操作法

1) 小試験管に基質溶液 1.0mL を入れ、37℃で約 5 分間予備加温します。
2) 測定試料を 0.1mL 加え、良く混合して反応を開始します。
3) 37℃で正確に 10 分間反応させた後、反応停止液を 2.0mL 加え良く混合して、反応を停止させます。
4) この反応終了液を、37℃で約 5 分間予備加温させた後、定量用酵素液を 0.1mL 加え、良く混合して定量反応を開始します。
5) 37℃で 20 分間反応させた後、定量用発色液を 0.1mL 加え良く混合して、さらに 10 分間定量反応を続けます。
6) この反応終了液を吸光度測定用セルに入れ、460nm の波長で吸光度を測定します(測定試料の吸光度・・計算方法の Es 値となります*7)。なお、吸光度測定時の対照は蒸留水とします。
7) ブランク値の測定は、上記基質液 1)を 37℃で 15 分間加温後、反応停止液を 2.0mL 加えて良く混合し、さらに測定試料を 0.1mL 加えて再び混合します。以下、4)、5)の操作を行い吸光度を 6)と同様にして測定します(ブランクの吸光度・・計算方法の Eb 値となります)。
8) 標準値の測定は、測定試料の代わりにキットに添付されている標準液を用います.測定手順は、7)と同様に行います(標準液の吸光度・・計算方法の Estd 値となります)。
9) 発色ブランク値の測定は、2)において測定試料の代わりに蒸留水を用います。以下 3)～5)の操作を行い吸光度を 6)と同様にして測定します(発色ブランクの吸光度・・計算方法の Ec 値となります)。

*8 測定試料の吸光度(Es)が 1.0 を越えた場合は 5 倍に希釈した濾液を蒸留水にてさらに 2 倍に希釈して再測定して下さい。

©2011 Kikkoman Corp. (20150201)

吸光度測定条件

波長:460 nm　　キュベット:光路長 1cm
対照:蒸留水　　最終液量:3.3mL

	測定試料	測定試料ブランク	標準	発色ブランク
基質溶液(mL)	1.0	1.0	1.0	1.0
測定試料(mL)	0.1	0.1	ー	ー
標準液(mL)	ー	ー	0.1	ー
蒸留水(mL)	ー	ー	ー	0.1
反応停止液(mL)	2.0	2.0	2.0	2.0
定量用酵素液	0.1	0.1	0.1	0.1
定量用発色液(mL)	0.1	0.1	0.1	0.1
	Es	Eb	Estd	Ec

数字は添加量(mL)、ーは無添加を表す。

4. 酸性カルボキシペプチダーゼ活性の計算方法

1) 酸性カルボキシペプチダーゼ活性の求め方

酸性カルボキシペプチダーゼ活性(U/mL)
＝(Es－Eb)÷(Estd-Ec)×0.1×df
＝(Es－Eb)÷(Estd-Ec)×0.5 (*)
(*)測定試料を 5 倍に希釈した場合。
但し、Es:測定試料の吸光度、Eb:ブランクの吸光度、
Estd:標準液の吸光度、Ec:発色ブランクの吸光度、
df:測定試料の希釈倍率。

なお、式中の 0.1 は標準液を用いた測定で反応液中に含まれる L-アラニン量(0.1μmol)です。

酸性カルボキシペプチダーゼの 1U は、ここで記した測定条件において、1 分間に Cbz-Tyr-Ala から 1μmol の L-アラニン(L-Ala)を遊離する力価と定義します。

2) 米麹中の酸性カルボキシペプチダーゼ活性の求め方

酸性カルボキシペプチダーゼ活性(U/g・麹)
＝(Es－Eb)÷(Estd-Ec)×0.1×df×抽出率
＝(Es－Eb)÷(Estd-Ec)×2.5 (**)
(**)この計算は、米麹を所定法通りに抽出し(抽出率 5 倍)、得られた抽出液を 5 倍に希釈して(df=5)測定試料とした場合。

〔性能〕

1. ブランク値:本測定系において発色ブランク値の吸光度は、通常 0.06 以下です。
2. 特異性:測定試料中に含まれる各アミノ酸濃度が少なくとも 0.60mM まで、測定値は影響を受けません。
3. 再現性:同一測定試料を 15 回同時に測定するとき、吸光度の CV値は 1.65%以下です。
4. 測定範囲:E(測定試料測定時の吸光度 Es 値ーブランク測定時の吸光度 Eb 値)が 1.5 まで定量性があります。
5. 発色の安定性:反応終了液の吸光度は、室温(25℃)において、少なくとも 90 分間は変化が見られません。

〔相関性〕

本法(x)と国税庁所定分析法(y)との間で米麹中の酸性カルボキシペプチダーゼを測定試料として相関性を検討したところ、
回帰式は y = 2877.5 x 、相関係数 r は 0.996 でした。
但し、x および y の単位は U/mL です。
本測定法で得られた米麹抽出液中の酸性カルボキシペプチダーゼ活性を所定法に準じて表現するには、次式にて計算できます。すなわち、

所定法による酸性カルボキシペプチダーゼ活性(U/mL)
＝ 2877.5 x
および、
所定法による酸性カルボキシペプチダーゼ活性(U/g・麹)
＝ (2877.5 x)×抽出率
但し、x は本測定法で得られた酸性カルボキシペプチダーゼ活性(U/mL)(4-1 にて求めた値)、抽出率は所定法に準じて米麹を抽出し、抽出液を測定試料とした場合では 5、透析液を測定試料とした場合には 10 となります。

〔使用上又は取扱い上の注意〕

①本キットの試薬類は全て冷暗所(2～8℃)にて保管して下さい。室温に放置した場合、測定値が低下します。有効期限を過ぎたものは使用しないで下さい。試薬類を凍結させないで下さい。
②安全性の確保のために次のことにご注意下さい。

各試薬溶液を口に入れたり、直接手で触れたり、眼に入れたりしないで下さい。使用後の器具を洗浄する際は、手袋を使用して下さい。誤って飲み込んだり眼に入った場合は、口や眼を水にて良くすすいだ後、直ちに医師に連絡を取り診察を受けて下さい。手に付いた場合は、水で良く洗浄して下さい。また、食品類への混入がないよう充分ご注意下さい。廃液処理の際は、地下水及び上水道へ混入しないよう注意して下さい。

基質溶液以外の試薬類に防腐剤として含まれているアジ化ナトリウムは銅や鉛などの重金属と結合してアジ化物となります。重金属のアジ化物は乾燥状態で衝撃により爆発する性質がありますので、排水後は、配水管に残留しないように十分量の水で洗い流して下さい。また、試薬溶液と酸性溶液を混合しないで下さい、毒性ガスが発生する場合があります。

③試薬類は希釈して使用しないで下さい。
④本キットは簡便法ですので、必要に応じて所定分析法を併用して下さい。

〔廃棄の方法〕

基質溶液および反応停止液の容器はガラス製、キャップはポリプロピレン製、パッキンはポリエチレン製になっています。定量用酵素液、定量用発色液および標準液は、本体はポリエチレン製、キャップはポリプロピレン製です。廃棄の際は、各々を分別して、都道府県・市町村が定める廃棄物の適正処理に従って廃棄処理してください。

〔保存方法〕

1)キットの保存:冷暗所(2～8℃)にて保存。
2)使用期限:本キットの外箱に記載。

〔保証〕

製造元では、本製品が所期の品質を有することおよび、本製品に不具合があった場合代替の製品を提供することを保証しますが、それ以外の保証は致しません。製造元は、特別な若しくは結果として生じる損害または、本製品の使用から直接的または間接的に生じる費用を含むいかなる損害にも責任は負いません。

〔参考文献〕

鈴木ら:平成 9 年度日本醸造学会大会講演要旨集 p5

製造元　キッコーマンバイオケミファ株式会社
〒105-0003 東京都港区西新橋 2-1-1
Tel: 03-5521-5490　Fax: 03-5521-5498
E-mail: biochemifa@mail.kikkoman.co.jp
URL: http://biochemifa.kikkoman.co.jp/

©2011 Kikkoman Corp. (20150201)